植物分类学报 39(4):337~344(2001) [创刊50周年纪念特刊]
Acta Phytotaxonomica Sinica [Golden Jubilee issue]

从叶绿体 DNA *trn* L-F 序列论双参属的归属问题

[1]张文蘅 [2]陈之端 [1]陈虎彪 [2]汤彦承
[1](北京大学药学院天然药物学系 北京 100083)
[2](中国科学院植物研究所系统与进化植物学开放研究实验室 北京 100093)

Phylogenetic relationships of the disputed genus *Triplostegia* based on *trn* L-F sequences

[1]ZHANG Wen-Heng [2]CHEN Zhi-Duan [1]CHEN Hu-Biao [2]TANG Yan-Cheng
[1](*Department of Natural Medicines, School of Pharmaceutical Sciences, Peking University*, Beijing 100083)
[2](*Laboratory of Systematic and Evolutionary Botany, Institute of Botany, the Chinese Academy of Sciences*, Beijing 100093)

Abstract The phylogenetic relationships of *Triplostegia* Wall. ex DC., comprising two species of perennial herbs from southeastern Asia, have long been in dispute. This genus was placed in either Dipsacaceae or Valerianaceae or in a family of its own, Triplostegiaceae. In this paper, the chloroplast DNA (cpDNA) *trn* L-F regions of 21 species in the Dipsacales s.l. (including Valerianaceae, Dipsacaceae, *Triplostegia*, *Morina*, Caprifoliaceae s.l. and Adoxaceae) and an outgroup *Panax schin-seng* Nees. were amplified and sequenced. The phylogenetic relationships among these 22 species were constructed based on *trn* L-F sequences. The results demonstrated that Valerianaceae, Dipsacaceae, *Triplostegia*, *Morina* and four genera from the Caprifoliaceae s.l. form a monophyletic group with a strong support (100% bootstrap). *Triplostegia*, a sister group to Dipsacaceae, is close enough to be placed in the Dipsacaceae as a subfamily. The traditional Caprifoliaceae s.l. are polyphyletic, and relationships of *Morina* among the groups within Dipsacales s.l. are uncertain.
Key words *Triplostegia*; Caprifoliaceae s.l.; *Morina*; Dipsacales s.l.; *trn* L-F sequences; Systematic position

摘要 双参属 *Triplostegia* Wall. ex DC.由分布于东南亚地区的2个种组成,为多年生草本植物。它的归属一直存在争议,有时置于川续断科 Dipsacaceae 或败酱科 Valerianaceae,有时单立一科,即双参科 Triplostegiaceae。本研究对广义川续断目 Dipsacales s.l.的21种植物(分别来自于败酱科、川续断科、双参属、刺参属 *Morina*、广义忍冬科 Caprifoliaceae s.l.、五福花科 Adoxaceae)和外类群人参 *Panax schin-seng* Nees.的叶绿体 DNA *trn* L-F 区进行了测序,并建立系统发育树状图。结果显示,败酱科、川续断科、双参属、刺参属和广义忍冬科的4个属(双盾木属 *Dipelta*、蝟实属 *Kolkwitzia*、六道木属 *Abelia* 和北极花属 *Linnaea*)形成了一个单系群并得到了很强的支持(100% bootstrap);双参属与川续断科有更近的关系,建议作为一个亚科置于川续断科;广义忍冬科为一多系类群;而刺参属与其他广义川续断目类群之间的关系尚不能确定。

关键词 双参属; 广义忍冬科; 刺参属; 广义川续断目; *trn* L-F 序列; 系统位置

大多数分类学家都认为川续断科 Dipsacaceae 和败酱科 Valerianaceae 有很近的亲缘关系。但是,对于与这二科关系较近的刺参属 *Morina*,广义忍冬科 Caprifoliaceae s.l.,特别是由2个种组成的分布于东南亚地区(包括印度、尼泊尔、锡金、不丹、缅甸、印度尼西亚、新

2000-12-01 收稿,2001-03-22 收修改稿。
基金项目:国家自然科学基金(NSFC-39970057)资助项目。

几内亚及我国西南部和台湾)的多年生草本植物双参属 *Triplostegia* Wall. ex DC.的系统位置问题一直存在争议。该属有时被置于川续断科,有时置于败酱科,有时单立一科——双参科 Triplostegiaceae。本研究通过对叶绿体 DNA *trn*L-F 序列进行分析,探讨了双参属的系统位置。但为了把问题探讨得更深入,我们把双参属置于广义的川续断目的背景下来研究。因此取样涉及广义川续断目 Dipsacales s.l.中的广义忍冬科 Caprifoliaceae s.l.和五福花科 Adoxaceae,并以五加科 Araliaceae 的人参 *Panax schin-seng* Nees.作为外类群(Olmstead *et al*., 2000)。

1 材料和方法

取川续断目(广义)包括双参属的两个种在内的 21 种植物和外类群人参的新鲜叶子在硅胶中干燥。材料来源见表 1,凭证标本存放于中国科学院植物研究所标本馆(PE)和北京大学药学院植物标本馆(PEM)中。

总 DNA 的提取采用 Bousquet *et al*.(1990)的方法。*trn*L-F 区使用通用引物"c" 5′CGA AAT CGG TAG ACG CTA CG3′和"f" 5′ATT TGA ACT GGT GAC ACG AG3′(Taberlet *et al*., 1991),通过多聚酶链反应(PCR)进行扩增。扩增反应和测序反应在 PE 公司的 9600 型 PCR 仪上进行,在 ABI 377 自动测序仪上进行测序。序列排列用 CLUSTAL W 软件(Higgins,1994)自动完成,并进行适当的手工校正。排列好的序列用 PAUP4.0b4a(PPC)软件进行系统发育分析。

2 实验结果

广义川续断目的 *trn*L-F 序列长度在 841 bp 至 968 bp 范围内变化。整个 *trn*L-F 区又分为三部分:*trn*L 内含子 413 ~ 539 bp,*trn*L3′外显子 48 bp,和 *trn*L-F 间隔区 367 ~ 400 bp。22 种植物的 *trn*L-F 序列排列后的总长为 1106 bp,其中 298 个位点为变异位点,153 个位点为系统发育的信息位点。信息位点数目占 *trn*L-F 序列总长的 13.83%。

在广义川续断目 *trn*L-F 序列排成的矩阵中,大约有 30 个位置的插入/缺失,并且这些插入/缺失一般都是其附近序列的简单重复。由于这些插入/缺失较多又较长(1 ~ 86 bp),如果将 gaps 作为 fifth base 状态处理,gaps 应给予不同的权重。在本文中,我们将 gaps 只作为 missing 状态处理。

当 gaps 作为 missing 状态处理时,人参作为外类群(Olmstead *et al*., 2000),用 heuristic 法分析广义川续断目中 21 个类群时,发现共有 12 棵步长为 402 的最大简约树(CI = 0.863,RI = 0.856)。在 50%多数原则一致树上(图 1),五福花科在原广义川续断目中为处于最基部的一支。广义忍冬科被分成了 4 部分。接骨木属 *Sambucus* 和荚蒾属 *Viburnum* 与五福花科的华福花属 *Sinadoxa* 和五福花属 *Adoxa* 形成支持率很强的一支(100% bootstrap);锦带花属 *Weigela* 独自成为一支;忍冬属 *Lonicera*、莛子藨属 *Triosteum*、毛核木属 *Symphoricarpos* 和鬼吹箫属 *Leycesteria* 形成一支,支持率为 100% bootstrap。双盾木属 *Dipelta*、蝟实属 *Kolkwitzia*、六道木属 *Abelia* 和北极花属 *Linnaea* 形成一支,支持率为 99% bootstrap。其中双盾木属、蝟实属、六道木属、北极花属又和败酱科、川续断科、双参属、刺参属结合成单系群并得到很强的支持率(100% bootstrap)(图1的A群)。这一单系群又被分

表1 实验材料来源及 GenBank 序列号
Table 1 The source of materials and GenBank Accession No.

分类群 Species	采集地点 Locality	凭证标本 Voucher	序列号 Accession No.
败酱科 Valerianaceae			
糙叶败酱 *Patrinia rupestris* (Pall.) Juss. subsp. *scabra* (Bunge) H.J.Wang	北京松山 Songshan, Beijing	W.H.Zhang(张文蘅) Z99010(PEM)	AF366915
异叶败酱 *Patrinia heterophylla* Bunge	北京松山 Songshan, Beijing	W.H.Zhang(张文蘅) Z99006(PEM)	AF366916
欧缬草 *Valeriana officinalis* Linn.	北京中国科学院植物研究所植物园 Botanical Garden, CAS	W.H.Zhang(张文蘅) 001(PEM)	AF366917
川续断科 Dipsacaceae			
川续断 *Dipsacus asperoides* C.Y.Cheng et T.M.Ai	云南丽江 Lijiang, Yunnan	H.B.Chen(陈虎彪) 99032(PEM)	AF366919
华北蓝盆花 *Scabiosa tschiliensis* Grun.	北京松山 Songshan, Beijing	W.H.Zhang(张文蘅) Z99008(PEM)	AF366920
双参 *Triplostegia glandulifera* Wall. ex DC.	云南丽江 Lijiang, Yunnan	H.B.Chen(陈虎彪) 0001(PEM)	AF366921
大花双参 *Triplostegia grandiflora* Gagnep.	云南大理 Dali, Yunnan	H.B.Chen(陈虎彪) 0002(PEM)	AF366922
刺参科 Morinaceae			
白花刺参 *Morina nepalensis* D. Don var. *alba* (Hand.-Mazz.) Y.C.Tang	云南中甸 Zhongdian, Yunnan	H.B.Chen(陈虎彪) 0003(PEM)	AF366923
广义忍冬科 Caprifoliaceae s. l.			
糯米条 *Abelia chinensis* R.Br.	北京中国科学院植物研究所植物园 Botanical Garden, CAS	Z.D.Chen(陈之端) 2002(PE)	AF366913
云南双盾木 *Dipelta yunnanensis* Franch.	云南德钦 Deqen, Yunnan	S.R.Zhang(张树仁) 292(PE)	AF366911
蝟实 *Kolkwitzia amabilis* Graebn.	北京中国科学院植物研究所植物园 Botanical Garden, CAS	Z.D.Chen(陈之端) 2001(PE)	AF366914
狭萼鬼吹箫 *Leycesteria formosa* Wall. var. *stenosepala* Rehd.	云南中甸 Zhongdian, Yunnan	S.R.Zhang(张树仁) 255(PE)	AF366908
北极花 *Linnaea borealis* Linn.	吉林安国长白山 Changbaishan Mt., Anguo, Jilin	Z.D.Chen(陈之端) 2110(PE)	AF366912
蓝靛果 *Lonicera caerulea* Linn. var. *edulis* Turcz. ex Herd.	吉林通化长白山 Changbaishan Mt., Tonghua, Jilin	Z.D.Chen(陈之端) 2022(PE)	AF366905
接骨木 *Sambucus williamsii* Hance	吉林通化长白山 Changbaishan Mt., Tonghua, Jilin	C.W.Zhou(周成武) 001(PE)	AF366929
毛核木 *Symphoricarpos sinensis* Rehd.	湖北兴山 Xingshan, Hubei	H.D.Huang(黄汉东) 981311(PE)	AF366907
穿心莛子藨 *Triosteum himalayanum* Wall.	云南中甸 Zhongdian, Yunnan	S.R.Zhang(张树仁) 263(PE)	AF366906
欧洲荚蒾 *Viburnum opulus* Linn.	北京中国科学院植物研究所植物园 Botanical Garden, CAS	Z.D.Chen(陈之端) 2003(PE)	AF366928
锦带花 *Weigela florida* (Bunge) A.DC.	吉林通化长白山 Changbaishan Mt., Tonghua, Jilin	Z.D.Chen(陈之端) 2023(PE)	AF366910

Table 1 (continued)

分类群 Species	采集地点 Locality	凭证标本 Voucher	序列号 Accession No.
五福花科 Adoxaceae			
五福花 *Adoxa moschatelliana* Linn.	吉林通化长白山 Changbaishan Mt., Tonghua, Jilin	Z.D. Chen(陈之端) 2167(PE)	AF366927
华福花 *Sinadoxa corydalifolia* C.Y.Wu, Z.L.Wu et R.F.Huang	青海囊谦县 Nangqian, Qinghai	J.Q. Liu(刘建全) 625(PE)	AF366926
五加科 Araliaceae			
人参 *Panax schin-seng* Nees.	吉林通化 Tonghua, Jilin	Z.D. Chen(陈之端) 2031(PE)	AF366930

为4支。败酱属 *Patrinia* 和缬草属 *Valeriana* 以87% bootstrap支持率结合为一支;川续断属 *Dipsacus* 和蓝盆花属 *Scabiosa* 结合成一强支(100% bootstrap),再与双参属形成姊妹群,支持率为78% bootstrap;刺参属单独成为一支;广义忍冬科的4个属(双盾木属、蝟实属、六道木属、北极花属)形成一支(99% bootstrap)。

为了进一步了解前述4个支(图1的A群)之间的关系,我们分析了12棵最大简约树,发现刺参属的位置不稳定,在这4支之间漂移。对50%多数原则一致树(包括bootstrap值小于50%的分支)(图2)进行分析时,这4支被分为两姊妹群,广义忍冬科的4个属,即双盾木属、蝟实属、六道木属、北极花属为一群(99% bootstrap),其他属,即败酱属、缬草属、刺参属、川续断属、蓝盆花属和双参属为一群(31% bootstrap)。双参属仍然与川续断科的川续断属和蓝盆花属结合为一支(77% bootstrap),再与刺参属和败酱科的两个属(败酱属和缬草属)结合的一弱支(42% bootstrap)形成姊妹群。

3 讨论和结论

双参属分布于东南亚地区,由双参 *T. glandulifera* 和大花双参 *T. grandiflora* 2个种组成。该属的亲缘关系和系统位置一直存在争议,概括起来有3种处理意见:或归属于败酱科,或合并于川续断科,以及独立成单型的科——双参科 Triplostegiaceae。Backlund & Bremer(1998) 对双参属在1995年以前的归属问题作了简要的回顾,并附有简明的图表,在此不再赘述。近年来的研究结果主张将双参属独立成科(Takhtajan, 1997);而 Backlund & Nilsson(1997) 研究花粉形态的结果显示,双参属与败酱科关系更接近,被作为双参亚科 Triplostegioideae 置于败酱科内;Backlund & Thomas(1998) 在化学成分方面的研究也得出同样结论;此外 APG(1998)也认为双参属宜归并于败酱科。

对广义川续断目 *trn*L-F 序列进行的分析(图1)显示,败酱科、川续断科、双参属、刺参属和广义忍冬科的4个属(双盾木属、蝟实属、六道木属和北极花属)形成了一个单系群(图1的A群)。其中川续断属和蓝盆花属作为川续断科的代表结合为一强支(100% bootstrap);它又和双参属结合成一强支(78% bootstrap),显示双参属较之于败酱科与川续断科更为接近(图1,图2)。Caputo & Cozzolino(1994) 通过形态和孢粉学特征对川续断科进行了分支分类,该研究指定刺参科、双参科和败酱科作为外类群,将川续断科分为两大支,并建议作为两亚科(川续断亚科 Dipsacoideae 和蓝盆花亚科 Scabiosoideae)处理。根据

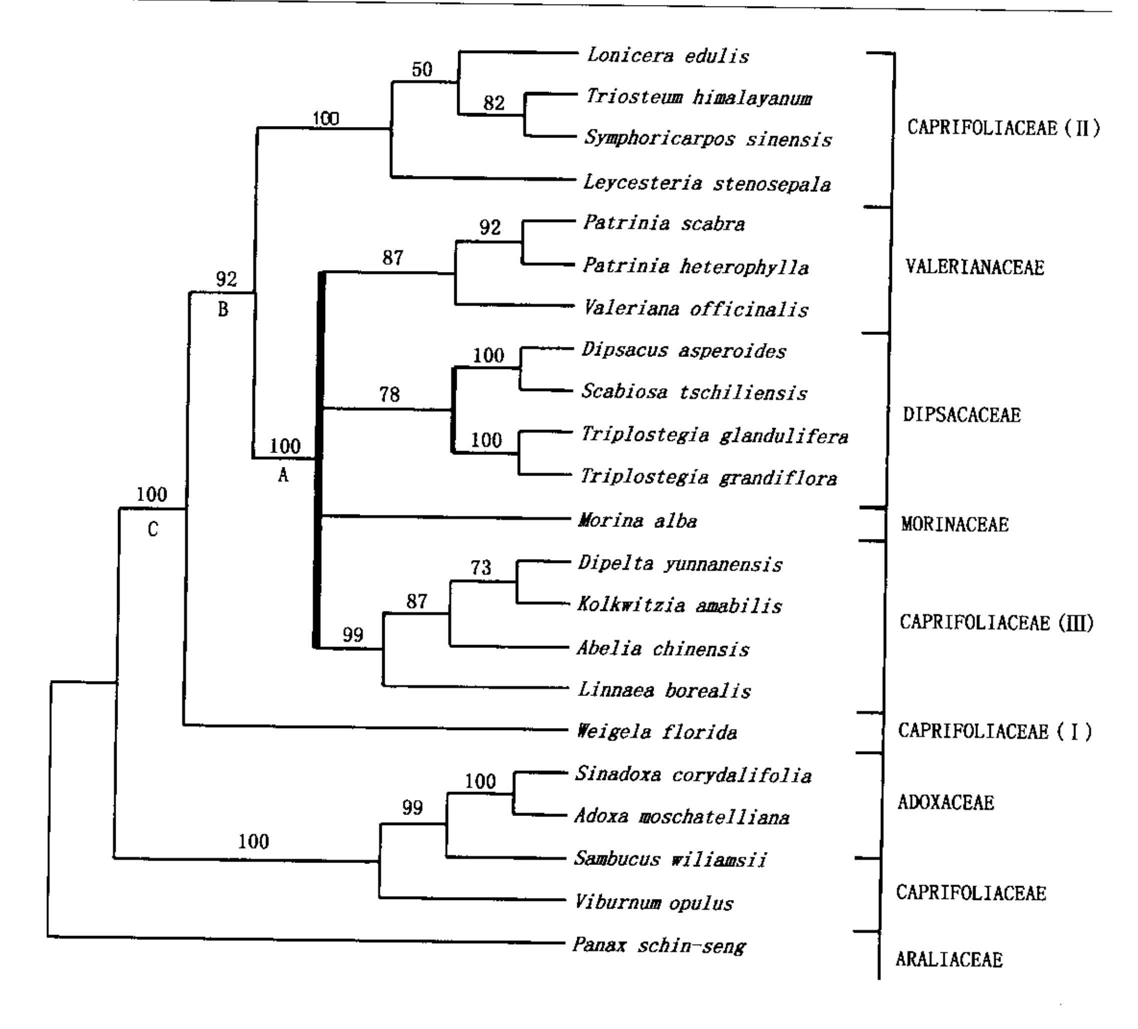


图1 根据双参属及广义川续断目叶绿体 DNA*trn*L-F 序列得到的 12 棵同等最简约树的 50%多数原则一致树(树长=403 步;CI=0.861;RI=0.853)。分支上面的数字代表 1000 次重复抽样检测的 bootstrap 值。人参作为指定外类群。
Fig.1　The 50% majority-rule consensus tree of twelve equally most parsimonious trees for *Triplostegia* and the Dipsacales s.l. based on cpDNA *trn*L-F sequences with gaps being treated as missing data. Length = 403 steps, CI = 0.861, RI = 0.853. Bootstrap analyses were conducted using 1000 resampling replicates. Bootstrap values are indicated above branches. *Panax schin-seng* Nees. is the designated outgroup.

本研究的结果,双参属宜合并于川续断科中,但又和川续断科有明显的区别。川续断亚科的代表川续断属和蓝盆花亚科的代表蓝盆花属的结合率为 100%bootstrap,而两属再与双参属的结合率分别只有 78%bootstrap 和 77%bootstrap(图 1,图 2),表明双参属与这两个亚科既有较近的亲缘关系又有较明显的区别。在形态上,双参属与川续断属和蓝盆花属也有较明显的区别,双参属植物的花组成疏松聚伞圆锥花序,小总苞片(副萼)两层,而川续断属和蓝盆花属具头状花序,小总苞片(副萼)一层(邱莲卿等, 1986)。因此,双参属可作为川续断科的一个亚科——双参亚科 Triplostegioideae,但这与 Backlund & Nilsson(1997) 把它置于败酱科中作为一个亚科处理是不同的。同时我们赞同 Backlund & Bremer(1998) 的意见,若双参属成立单属科没有过多的信息量,为了减少冗余名称不宜独立成科为好。

Rafinesque(1820) 将刺参属作为单型科,它的系统地位一直有争议,或独立成科或合

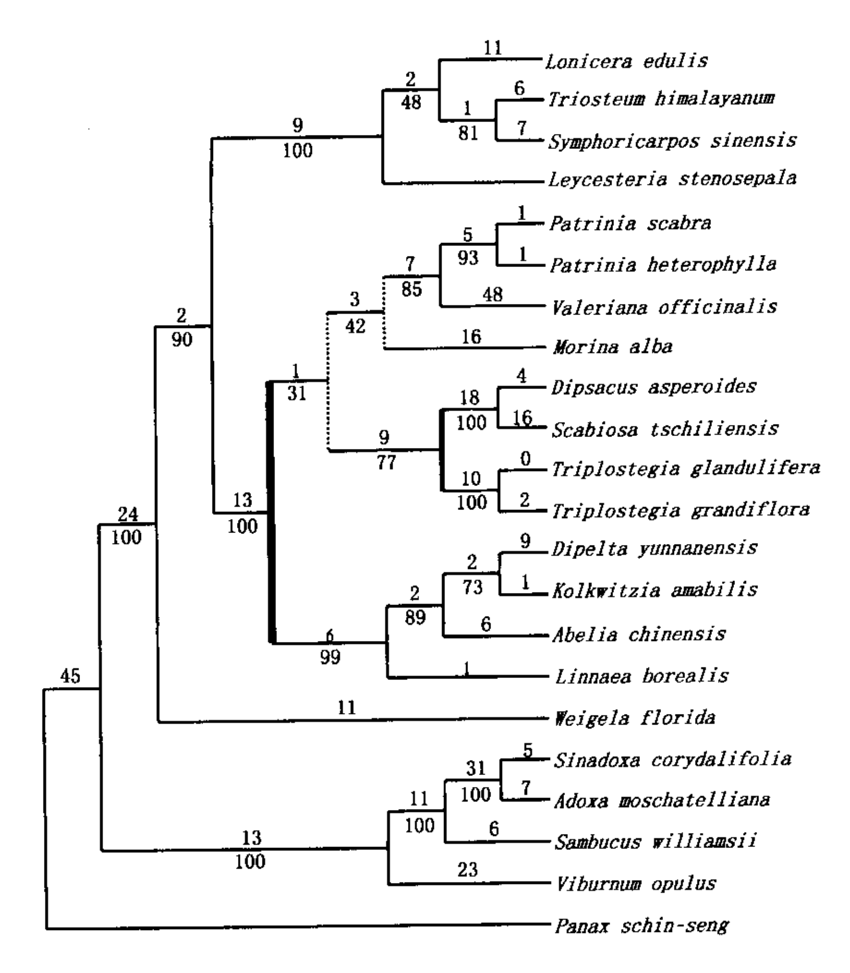


图2 根据双参属及广义川续断目叶绿体 DNA *trn*L-F 序列得到的 12 棵同等最简约树的 50% 多数原则一致树(包括 bootstrap 值小于 50% 的分支)(树长 = 402 步;CI = 0.863;RI = 0.856)。分支上面的数字代表步长,分支下面的数字代表 1000 次重复抽样检测的 bootstrap 值。人参作为指定外类群。

Fig.2 The 50% majority-rule consensus tree (plus other groups compatible with this tree) of twelve equally most parsimonious trees for *Triplostegia* and the Dipsacales s.l. based on cpDNA *trn*L-F sequences with gaps are treated as missing data. Length = 402 steps, CI = 0.863, RI = 0.856. Base substitutions are indicated above branches. Bootstrap values are indicated below branches. *Panax Schin-seng* Nees. is the designated outgroups.

并于川续断科。Backlund & Bremer(1998) 对刺参属在 1992 年以前的处理意见有一简明的回顾,并附有图表,在此不再赘述。近年来 Takhtajan(1997) 和 APG(1998) 都主张将其独立成科,但科内含有 1 属或 3 属是有争议的。Blackmore & Cannon(1983) 和 Cannon & Cannon(1984) 研究花粉和花部形态,主张本科分为 *Morina*, *Acanthocalyx* 和 *Cryptothladia* 3 个属。本研究只选取 *Morina nepalensis* var. *alba* 一种作为本科的代表,分析结果显示它的位置不稳定(图 1,图 2),今后还需要再密集取样,以确定其位置。

对于广义忍冬科是否为单系,近年来存在争议。*trn*L-F 序列分析结果与 *rbc*L 和 *ndh*F 序列分析的结果相似(Olmstead *et al*., 2000; Backlund & Bremer, 1997; Olmstead *et al*., 1993; Chase *et al*., 1993; Donoghue *et al*., 1992),都显示广义忍冬科是多系的(图 1)。本研究的结果表明接骨木属和荚蒾属更近于五福花科,五福花科(包括接骨木属和荚蒾属)与广义川续断目其他成员形成的一支(100% bootstrap)(图 1 的 C 群) 形成姊妹群。即使

如此，不包含接骨木属和荚蒾属的忍冬科仍然是多系的，分为3支：锦带花属为第Ⅰ支，忍冬属-莛子藨属-毛核木属-鬼吹箫属为第Ⅱ支，双盾木属-蝟实属-六道木属-北极花属为第Ⅲ支。第Ⅲ支与败酱科、川续断科（包括双参属）和刺参科形成一支，即A群（100% bootstrap）；第Ⅱ支与A群形成一支，即B群（92% bootstrap）；第Ⅰ支再与B群形成一支，即C群（100% bootstrap）。近年，Takhtajan（1997）认为广义忍冬科（不包含接骨木属和荚蒾属）为一独立科；而APG（1998）将广义忍冬科（不包含接骨木属和荚蒾属）分为狭义忍冬科 Caprifoliaceae s. str.，德维花科 Diervillaceae，北极花科 Linnaeaceae3个科。Backlund & Pyck（1998）对前人的研究进行了总结，根据形态和分子的证据构建了系统发育树，将接骨木属和荚蒾属置于五福花科，将广义忍冬科（不包含接骨木属和荚蒾属）分为 Diervillaceae，Caprifoliaceae s.str.和 Linnaeaceae3个科。本实验结果与他们得出的结论一致，第Ⅰ支相当于 Diervillaceae，第Ⅱ支相当于狭义的 Caprifoliaceae s. str.，第Ⅲ支相当于 Linnaeaceae。

综上所述，通过对叶绿体 DNA *trn*L-F 序列进行分析，结果显示双参属与川续断科有更近的亲缘关系，应置于川续断科中并作为双参亚科处理。刺参属位置不稳定，还需要进一步密集取样，实验分析才能确定它的位置。另外，本次研究还证实广义忍冬科为一多系类群，若遵从单系原则，本科（除 *Sambucus*，*Viburnum* 外）宜分成3科，即狭义忍冬科、德维花科和北极花科，至于这3科之间的关系，还需作进一步研究。

致谢　感谢张树仁、刘建全老师为本研究提供实验材料及黄姹姹、孙映雪、李昂在实验过程中给予的帮助。

参 考 文 献

Angiosperm Phylogeny Group (APG), 1998. An ordinal classification for the families of flowering plants. Ann MO Bot Gard, 85: 531 ~ 553

Backlund A, Bremer B, 1997. Phylogeny of the Asteridae s. str. based on *rbc*L sequences, with particular reference to the Dipsacales. Pl Syst Evol, 207: 225 ~ 254

Backlund A, Bremer K, 1998. To be or not to be —— principles of classification and monotypic plant families. Taxon, 47: 391 ~ 400

Backlund A, Nilsson S, 1997. Pollen morphology and the systematic position of *Triplostegia* (Dipsacales). Taxon, 46: 21 ~ 31

Backlund A, Pyck N, 1998. Diervillaceae and Linnaeaceae, two new families of Caprifolioids. Taxon, 47: 657 ~ 661

Backlund A, Thomas M, 1998. Phylogenetic implications of an expanded valepotriate distribution in the Valerianaceae. Biochem Syst Ecol, 26: 309 ~ 335

Blackmore S, Cannon M J, 1983. Palynology and systematics of Morinaceae. Rev Palaeobot Palynol, 40: 207 ~ 226

Bousquet J, Simon L, Lalonde M, 1990. DNA amplification from vegetative and sexual tissues of trees using polymerase chain reaction. Can J For Res, 20: 254 ~ 257

Cannon M J, Cannon J F M, 1984. A revision of Morinaceae (Magnoliophyta-Dipsacales). Bull Bot Mus (Natural History) Bot Ser, 12: 1 ~ 35

Caputo P, Cozzolino S, 1994. A cladistic analysis of Dipsacaceae (Dipsacales). Pl Syst Evol, 189: 41 ~ 61

Chase M W, Soltis, D E, Olmstead R G *et al*., 1993. Phylogenetics of seed plants: an analysis of nucleotide sequences from the plastid gene *rbc*L. Ann MO Bot Gard, 80: 528 ~ 580

Donoghue M J, Olmstead R G, Smith J F *et al*., 1992. Phylogenetic relationships of Dipsacales based on *rbc*L sequences. Ann MO Bot Gard, 79: 333 ~ 345

Higgins D G, 1994. CLUSTAL W: Multiple alignment of DNA and protein sequences. In: Griffin A M, Griffin H G eds, Computer Analysis of Sequence Data Part Ⅱ. New Jersey: Humana Press. 307 ~ 318

Olmstead R G, Bremer B, Scott K M *et al.*, 1993. A parsimony analysis of the Asteridae sensu lato based on *rbc*L sequences. Ann MO Bot Gard, 80: 700 ~ 722

Olmstead R G, Kim K-J, Jansen R K *et al.*, 2000. The Phylogeny of the Asteridae sensu lato based on chloroplast *ndh*F gene sequences. Mol Phylogenet Evol, 16: 96 ~ 112

Qiu L-Q(邱莲卿), Wang H-J(王汉津), He S-Y(贺士元) *et al.*, 1986. Dipsacaceae. In: Flora Reipublicae Popularis Sinicae. Beijing: Science Press. 73(1): 44 ~ 84

Rafinesque C S, 1820. Tableau analytique des ordes naturels. Ann Gen Sci Phys, 6: 88

Taberlet P, Gielly L, Pautou G *et al.*, 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. Plant Mol Biol, 17: 1105 ~ 1109

Takhtajan A, 1997. Diversity and Classification of Flowering Plants. New York: Columbia Univ. Press

(责任编辑 白羽红)